

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**SECRETOMA DO FUNGO BIOCONTROLADOR *Metarhizium*
anisopliae RELACIONADO À INFECÇÃO DO CARRAPATO
BOVINO *Rhipicephalus microplus***

KARINE SCHERER

Lajeado, Fevereiro de 2016

Karine Scherer

**SECRETOMA DO FUNGO BIOCONTROLADOR *Metarhizium
anisopliae* RELACIONADO À INFECÇÃO DO CARRAPATO
BOVINO *Rhipicephalus microplus***

Orientador: Dr. Walter Orlando Beys da Silva

Co-orientadores: Dr. Raul Antonio Sperotto

Dra. Lucélia Santi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia na Produção Primária de Alimentos.

Lajeado, Fevereiro de 2016

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Tema.....	11
1.2 Hipótese.....	12
1.3 Justificativa.....	12
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo Geral.....	12
1.4.2 Objetivos Específicos.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Controle biológico.....	14
2.2 Controle biológico e <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
2.3 O processo de infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
2.4 Enzimas presentes no processo de infecção.....	21
2.5 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	23
2.6 Proteômica.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Cultivo de <i>Metarhizium anisopliae</i>	27
3.1.1 Em arroz.....	27
3.1.2 Suspensão de esporos.....	27
3.1.3 Em meio líquido.....	28
3.2 Preparação das cutículas de carrapato.....	28
3.3 Quantificação das proteínas.....	28
3.4 Preparação da amostra para espectrometria.....	28
3.5 Espectrometria de massas.....	29
3.6 Análises de bioinformática.....	30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Enzimas de degradação da cutícula.....	40
4.2 Defesa, resistência e adesão.....	42
4.3 Análise comparativa de secretomas.....	43
5. CONCLUSÃO.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Aspecto morfológico do fungo *Metarhizium anisopliae* 17
- FIGURA 2** – Etapas do ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae* e possíveis mecanismos de penetração no hospedeiro 19
- FIGURA 3** – Distribuição e sobreposição de proteínas do secretoma de *Metarhizium anisopliae* quando crescido em meio contendo cutícula de *Rhipicephalus microplus* após 48 h comparado com o controle (glicose) 32

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Vantagens e desvantagens do controle biológico 15

TABELA 1 – Proteínas exclusivamente identificadas no secretoma de *Metarhizium anisopliae* quando cultivado por 48 h em condição artificial de infecção do carrapato *Rhipicephalus microplus* 33

TABELA 2 – Proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Metarhizium anisopliae* quando cultivado por 48 h em condição artificial de infecção do carrapato *Rhipicephalus microplus* quando comparado ao controle (glicose) 37

TABELA 3 – Proteínas comuns identificadas nos secretomas de *Metarhizium anisopliae* em meio contendo carapaça de *Rhipicephalus microplus* ou *Dysdercus peruvianus*, em 48 h 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LB – Luria Bertani

MS/MS – Espectrometria de Massas em tandem

NCBI – National Center for Biotechnology Information

RS – Rio Grande do Sul

UV - Ultravioleta

RESUMO

O controle biológico é considerado uma alternativa natural e ecológica para o controle de pragas, evitando os problemas causados pela utilização de agentes químicos. Na comparação entre as duas alternativas, o controle biológico apresenta inúmeras vantagens, principalmente quanto ao impacto ambiental, custo, manuseio, especificidade e não desenvolvimento de resistência. No entanto, os biopesticidas necessitam, na maioria das vezes, de mais tempo para efetivar o controle das pragas-alvo, quando comparado ao controle químico. Entre os microrganismos utilizados no controle biológico de pragas, o fungo *Metarhizium anisopliae* está entre os mais estudados e aplicados para diversas pragas, inclusive para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, um ectoparasita hematófago responsável por grandes prejuízos econômicos no Brasil e no mundo. O estudo do processo de infecção do hospedeiro pode contribuir muito na otimização do processo de biocontrole visando a redução do tempo de morte da praga a ser controlada. Neste trabalho, utilizando *shotgun proteomics* e um sistema de cultura *in vitro* indutor do sistema de infecção, identificamos mais de 400 proteínas. Destas, 133 foram exclusivas da condição de infecção e 56 diferencialmente reguladas quando comparadas ao controle. Nestes resultados, foram identificadas proteínas responsáveis pela degradação e penetração da cutícula, além de moduladores da resposta do hospedeiro e proteção do fungo. Muitas das proteínas foram identificadas pela primeira vez neste sistema e 12 aparentemente são compartilhadas na infecção de *M. anisopliae* em insetos, portanto, não estando relacionadas à especificidade ao hospedeiro. Este perfil de proteínas secretadas, identificadas neste trabalho, representa uma contribuição para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro e futuramente podem contribuir na otimização do controle biológico e na seleção de isolados mais eficientes especificamente para o carrapato bovino *R. microplus*.

Palavras chave: controle biológico, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus microplus*, proteômica

ABSTRACT

The biological control is considered a natural and ecologic alternative to control pests avoiding the issues related to the use of chemical compounds. The biocontrol presents several benefits as the lower environmental impact, cost, handling, specificity, and the non-development of resistant pest strains. However, normally biopesticides need more time to kill and control pests when compared to chemical control. Among microorganisms used in biological control the fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most studied and applied to control several pests, including the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. The understanding of the host infection process may contribute to optimize the biocontrol through the reduction of the time to kill the target pest. In this work, applying shotgun proteomics and an *in vitro* culture strategy to induce the infection system in *R. microplus* we identified more than 400 proteins. Among these proteins, 133 were exclusively identified in the infection condition and 56 were differentially regulated when compared to control. Several of these proteins are related to host-cuticle digestion and penetration, fungal defense and modulators of host immune system. Besides, many of these proteins are being reported for the first time linked to *M. anisopliae* infection and 12 are shared in infection of insects and probably not connected to host specificity. The secreted protein profile identified here represents a contribution to the understanding of host-pathogen interaction and may help to optimize the biocontrol and to select fungal isolates more specific and efficient to control the cattle tick *R. microplus*.

Keywords: biological control, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus microplus*, proteomics

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas químicos são utilizados há muito tempo na agricultura e pecuária. Entretanto, causam desequilíbrios ambientais e exterminam os inimigos naturais de diferentes pragas nas áreas de cultivo e adjacências em que são utilizados. Sabe-se que os insetos estão entre as pragas mais difíceis de controlar na agricultura, e a aplicação de pesticidas químicos sintéticos é problemática devido aos seus efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal e o meio ambiente. Além disso, outro grande entrave de sua utilização é o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos alvo. Desta maneira, o controle biológico assume uma importância cada vez maior, principalmente em um momento que se discute muito uma produção alternativa e ecologicamente correta, sem a presença de resíduos químicos, fazendo com que medidas de biocontrole sejam importantes para a manutenção de pragas abaixo do nível de dano econômico, juntamente com todos os benefícios inerentes ao seu uso.

Dentre os inimigos naturais aplicados como agentes biocontroladores, encontramos grupos bastante diversificados, sendo que os mais pesquisados para essa finalidade são microrganismos, como fungos e bactérias. Entre os fungos que apresentam grande potencial como biocontroladores, o fungo filamentoso e artropodopatogênico *Metarhizium anisopliae* está entre os mais estudados e aplicados, devido a sua eficiência no controle de artrópodes-praga, entre eles, o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. Este carrapato hematófago é responsável por causar grandes prejuízos na pecuária, pois causa danos no couro dos animais, na qualidade do leite e diminui a produção de carne. Além disso, prejudica a saúde

do animal infestado, causando sintomas como anemia, emagrecimento, apatia, além de outras alterações patológicas, podendo atuar como porta de entrada para infecções secundárias.

Estas infecções representam um impacto negativo para a atividade pecuária, comprometendo o processo de produção dos produtos de origem animal, causados pelos efeitos do parasitismo sobre a produtividade do gado (GRISI et al., 2014). Estudos verificaram que, 51% do prejuízo econômico está ligado a perdas na produção animal, enquanto que 49% está relacionado com a infestação de carrapatos e aos custos com o uso de pesticidas químicos (JONSSON et al., 2001). Além disso, a crescente detecção de populações de carrapatos resistentes torna-se uma ameaça para a economia pecuária, devido à dificuldade de controle deste parasita, elevando os custos com pesticidas e, com a consequente dificuldade de comercializar o seu produto final (DOMINGUEZ-GARCÍA et al., 2010).

Neste sentido, o controle biológico do carrapato não passa a ser somente uma alternativa ecologicamente correta e promissora, mas talvez a única. Inúmeros trabalhos vêm atestando o potencial uso de *M. anisopliae* para o controle do carrapato e estudando o processo de infecção do hospedeiro. O entendimento do mecanismo molecular do biocontrole pode contribuir muito para sua otimização no que se refere ao desenvolvimento de formulações mais eficientes e na seleção de isolados específicos com maior virulência. Assim, neste trabalho, diversas proteínas foram identificadas no secretoma de *M. anisopliae* em condição experimental artificial de infecção do carrapato bovino *R. microplus*. A identificação deste secretoma contribui para o entendimento do processo de infecção e futuramente pode ser aplicado na otimização do controle biológico especificamente para o carrapato bovino *R. microplus*.

1.1 Tema

O secretoma de *M. anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato bovino *R. microplus*.

1.2 Hipótese

A secreção de proteínas de *M. anisopliae* induzidas pela presença da cutícula do carrapato bovino *R. microplus* está relacionada com a infecção.

1.3 Justificativa

O controle biológico, se comparado ao controle químico, apresenta inúmeras vantagens, pois causa um menor impacto ambiental, não apresenta riscos à saúde humana e animal, não contamina o solo e a água, além de não desenvolver resistência por parte da praga. Além disso, especificamente no caso do carrapato bovino, causador de grande impacto econômico na produção de couro, carne e leite, no Brasil e no mundo, já existem cepas resistentes aos acaricidas disponíveis comercialmente. No entanto, os biopesticidas, em geral, ainda carecem de um tempo maior para efetivar o controle das pragas-alvo, quando comparados aos pesticidas químicos. Para obter um resultado mais eficiente, através da seleção de novos isolados ou desenvolvimento de formulações, faz-se necessário identificar os mecanismos moleculares relacionados à infecção do hospedeiro, principalmente quais proteínas estão envolvidas neste processo. Desta maneira, novas abordagens, como genômica e proteômica, vem sendo utilizadas em estudos a nível molecular da interação patógeno-hospedeiro.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Identificar e analisar as proteínas secretadas pelo fungo *M. anisopliae* relacionadas ao processo de infecção do carrapato bovino *R. microplus*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Identificar as proteínas secretadas por *M. anisopliae* diferencialmente expressas em condições de infecção do carrapato bovino *in vitro* comparadas com uma condição controle.

- Comparar o secretoma artificial da infecção de *M. anisopliae* sobre o carrapato bovino com o modelo do inseto *Dysdercus peruvianus*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Controle Biológico

O tamanho de uma população é determinado por uma série de fatores inerentes à espécie e relacionados com o potencial biótico, taxa de reprodução, habilidade de migrar e adaptar-se a novos habitats, mecanismos de defesa, habilidade de tolerar condições adversas, entre outros. Já os fatores ecológicos extrínsecos são aqueles que podem ser de natureza física, como temperatura, umidade relativa do ar, radiação solar, juntamente com os de natureza biológica, como organismos competidores, parasitas ou predadores. Isto caracteriza o que se chama de controle natural das populações, que é a regulação do número de indivíduos de uma população pela ação coletiva dos fatores ecológicos de natureza física e biológica (ALVES, 1998; PARRA et al., 2002).

Desta forma o controle biológico, baseado nas relações ecológicas entre os seres vivos de cada espécie, seja animal, vegetal ou microbiana, consiste em utilizar organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros, podendo ser utilizados no controle de populações específicas que possam vir a se tornar pragas (MELO & AZEVEDO, 1998).

A utilização de microrganismos para o controle biológico de pragas e vetores de doenças foi proposta pela primeira vez na metade do século XIX. No entanto, seu potencial completo e suas vantagens começaram a ser aplicados em escala comercial recentemente. Isto ocorreu, pois alguns fatores, como a dificuldade em isolar e identificar potenciais agentes controladores e o desenvolvimento de fórmulas

adequadas para maximizar a sua eficiência, dificultavam uma utilização mais ampla (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010; BEYS DA SILVA et al., 2012; WEBSTER et al., 2015). Quando comparado com o controle químico, o controle biológico é uma alternativa vantajosa, apresentando baixa toxicidade, baixo impacto ambiental, não oferecendo risco à saúde humana e animal, não desenvolvimento de resistência e alta especificidade (ALVES, 1998; DONG & ZHANG, 2006; HECKEL, 2012). No entanto, o uso do controle biológico ainda apresenta alguns entraves, como necessidade de um período maior de tempo na efetivação do controle das pragas, se comparado aos seus correspondentes químicos, além da dependência de condições climáticas adequadas, limitando seu interesse comercial (Quadro 1) (ALVES, 1998; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

Quadro 1: Vantagens e desvantagens do controle biológico (Adaptado de MESSIAS, 1989; ALVES, 1998).

Vantagens do Controle Biológico	Desvantagens do Controle Biológico
Especificidade e seletividade	Necessidade de condições ambientais favoráveis, como temperatura, umidade e luminosidade para que determinados patógenos sejam eficientes
Atóxicos e não poluentes, se manuseados e selecionados corretamente	Ação mais lenta
Não desenvolvimento de resistência por parte dos organismos-alvo	Maiores cuidados no armazenamento, para que não ocorra perda da viabilidade
Custo relativamente mais baixo	
Capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente	

Entre os agentes utilizados no controle biológico, os microrganismos ganham destaque devido à facilidade de manuseio e aplicação, custo e conhecimento do processo de produção. E, entre estes, os fungos filamentosos são os

microrganismos de maior destaque, uma vez que têm a capacidade de se desenvolver diretamente sobre o tegumento do hospedeiro, sem necessidade de ingestão (SHAH & PELL, 2003).

Os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados para o controle biológico de insetos, tendo maior destaque os gêneros *Archersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH & PELL, 2003). Sua grande variabilidade genética pode ser considerada uma das suas principais vantagens para uso como biocontrolador (ALVES, 1998; LEITE et al., 2003). Alguns trabalhos sugerem que a utilização de fungos entomopatogênicos em artrópodes não hospedeiros apresenta efeitos mínimos, tornando-os uma alternativa segura para uso em programas de manejo integrado de pragas, se comparados aos inseticidas químicos (SANTI, 2009).

Com o avanço nos estudos e conseqüentemente maior conhecimento sobre o assunto, o controle biológico de pragas tem se tornado cada vez mais atraente comercialmente. O êxito na aplicação comercial de microrganismos, especialmente fungos filamentosos na proteção contra pragas agrícolas, vem obtendo grande progresso em pesquisas e testes de campo (BEYS DA SILVA et al., 2012), sendo que os isolados pertencentes às espécies *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* são os mais estudados e utilizados (SANTI, 2009; BEYS-DA-SILVA et al., 2012; 2014).

2.2 Controle biológico e *Metarhizium anisopliae*

O fungo filamentoso *M. anisopliae* (Figura 1) é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos, na rizosfera e nas raízes de plantas, bem como no exoesqueleto de artrópodes, atuando como saprófita. Este fungo pode atuar também como parasita, infectando mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, de pragas agrícolas a vetores de doenças humanas e aracnídeos, como a aranha marrom *Loxosceles* sp. (ALVES, 1998; SHAH & PELL, 2003; BEYS DA SILVA et al., 2012; BEYS-DA-SILVA et al., 2013; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; WEBSTER et al., 2015).

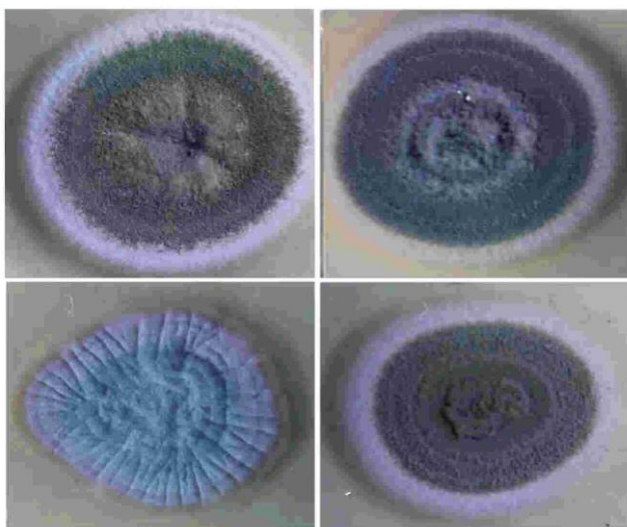


FIGURA 1: Aspecto morfológico do fungo *Metarhizium anisopliae* (Fonte: <http://www.ufrgs.br/depbiot/205/metani.htm>)

M. anisopliae é, portanto, considerado entomopatogênico, apresentando também propriedades acaricidas. Possui micélio hialino e septado, com conidióforos, dos quais surgem os conídios. Foi isolado pela primeira vez como agente microbiano contra insetos pelo russo Ilya Metchnikoff em 1879, a partir de uma praga de cereais, sendo utilizado para controlar o besouro *Anisoplia*. Este Ascomiceto é um dos fungos artropodopatogênicos melhor caracterizados e também um dos mais aplicados em programas de controle biológico contra vários tipos de praga. No Brasil, desde a década de 70, apresenta ampla utilização no controle de insetos-praga da agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* (ALVES, 1998; BEYS DA SILVA et al., 2012; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Atualmente é utilizado para o controle de diversas outras pragas, como a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta*), a broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), a broca-dos-citrus (*Diploschema rotundicolle*), a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), o cupim da cana-de-açúcar (gênero *Heterotermes*) e o cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*) (ALVES, 1998).

Na natureza, os conídios de *M. anisopliae* são a forma infecciosa, ou seja, são os conídios que iniciam o ciclo de infecção no hospedeiro, através do contato e reconhecimento da cutícula e adesão diretamente sobre a superfície de um

hospedeiro suscetível, desencadeando processos mecânicos e enzimáticos (ARRUDA et al., 2005). O potencial artropodopatogênico deste fungo para controle microbiano de organismos tem sido muito estudado, mas seus padrões de dispersão artificial e aplicação em culturas tem recebido pouca atenção. Entender os mecanismos moleculares da interação fungo-hospedeiro e identificar as proteínas especificamente expressas durante o processo de infecção é fundamental para melhorar as aplicações do biocontrole. As informações adquiridas poderão ser aplicadas para otimizar formulações comerciais ou identificar isolados mais eficientes na natureza ou em bibliotecas fúngicas.

2.3 O processo de infecção de *Metarhizium anisopliae*

Em relação aos artrópodes, a cutícula atua como uma barreira extremamente complexa para os fungos penetrarem, protegendo os mesmos contra o parasitismo e o desenvolvimento de doenças (VINCENT & WEGST, 2004). A patogenicidade de *M. anisopliae* está, inicialmente, relacionada com a estratégia sinérgica de secretar uma combinação de enzimas hidrolíticas, responsáveis por degradar a cutícula do hospedeiro, associadas com a pressão mecânica exercida pelo apressório (hifa modificada) (SANTI et al., 2010-b). Assim, o processo de infecção de *M. anisopliae* começa com a adesão do conídio na superfície do hospedeiro seguido pela penetração ativa da cutícula. Todo este processo é dependente de características ambientais, da interação patógeno-hospedeiro e da estrutura, topologia e composição química da cutícula, interferindo na adesão dos esporos e conseqüentemente na patogenicidade (WANG & ST LEGER, 2005; SANTI et al., 2010-b). A Figura 2 mostra as sucessivas e distintas etapas do processo de infecção, iniciando com a adesão do fungo sobre o tegumento do hospedeiro, seguido pela germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas do fungo e produção de esporos (ALVES, 1998; ARRUDA et al., 2005; SILVA, 2005).

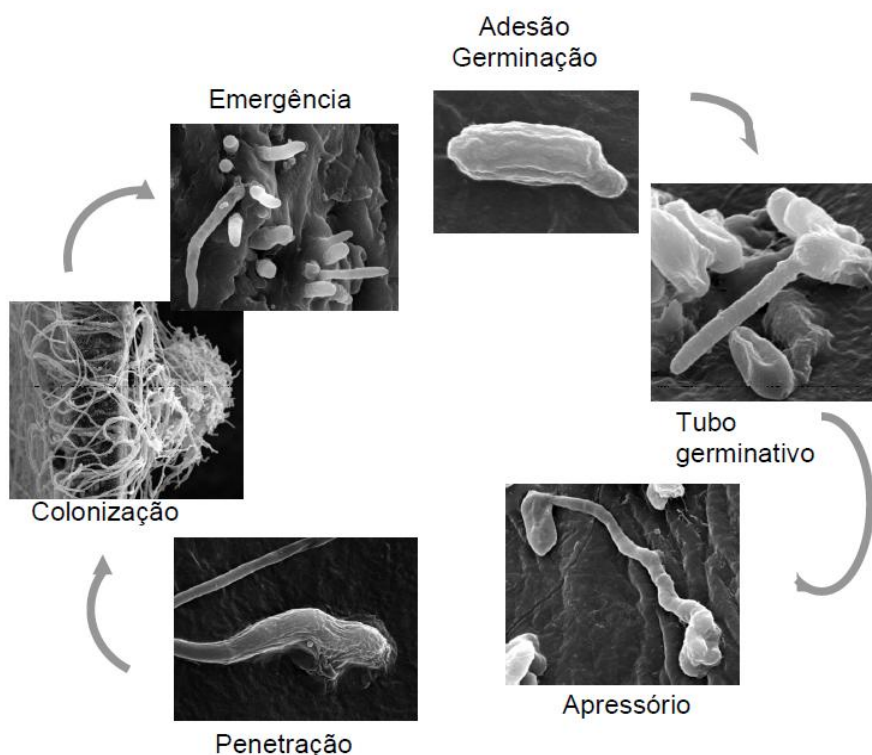


FIGURA 2: Etapas do ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae* e possíveis mecanismos de penetração no hospedeiro (Fonte: SANTI, L. 2009, modificado de ARRUDA, 2005).

Conforme ilustrado na Figura 2, o processo de infecção inicia com a adesão dos esporos, seguido pela germinação dos mesmos sobre a cutícula do hospedeiro. A adesão do esporo é mediada por uma interação hidrofóbica entre proteínas apolares, as hidrofobinas, e a camada lipídica do hospedeiro (ST LEGER et al., 1992; FANG et al., 2007), bem como pela secreção de adesinas (WANG & ST LEGER, 2007). *M. anisopliae* tem a capacidade de reconhecer sinais específicos do hospedeiro, provavelmente relacionados com lipídios da epicutícula, sendo que a sua especificidade é dependente destes sinais (PEDRINI et al., 2007; SANTI et al., 2010-b). Acredita-se que componentes específicos da cutícula dos artrópodes poderiam determinar a patogenicidade em diferentes hospedeiros (SANTI et al., 2010-b; BEYS-DA-SILVA et al., 2014), uma vez que os componentes presentes na epicutícula são extremamente heterogêneos, inclusive entre artrópodes do mesmo gênero (ST LEGER et al., 1991-a). Na superfície do esporo ainda não germinado

foram detectadas diversas enzimas relacionadas com a proteção do conídio, germinação, adesão, toxicidade, penetração e nutrição (como proteases, esterases, fosfolipase C, quitinases, superóxido dismutase (SOD) e catalase) (SANTI et al., 2010-a). Esta diversidade de enzimas refletiria a capacidade do fungo em responder e atacar o hospedeiro durante a fase inicial de forma rápida e eficiente.

Após a germinação do esporo, ocorre a diferenciação do tubo germinativo por dilatação da extremidade das hifas e consequente formação do apressório, estrutura modificada, conservada em diversos grupos de fungos, que penetra na cutícula do hospedeiro via pressão mecânica (ST LEGER et al., 1991; BEYS DA SILVA et al., 2012). Finalizada a formação do apressório, são desenvolvidas estruturas chamadas grampos de penetração, responsáveis por alterar a parede do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais finas e salientes (ST LEGER et al., 1991; CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Neste processo, observa-se a produção de algumas enzimas fundamentais para a degradação da cutícula, como lipases/esterases, quitinases e proteases (KRIEGER DE MORAES et al., 2003; SILVA et al., 2005; BEYS DA SILVA et al., 2010-a).

No momento em que o fungo inicia a etapa de colonização, ocorre um espessamento nas hifas que atravessam a cutícula do hospedeiro, ramificando-se primeiramente no tegumento, seguindo para a cavidade geral do corpo, onde toxinas do tipo destruxinas afetam os canais de transporte de íons relacionados com a atividade muscular e a integridade da membrana celular, causando sintomas como inquietação, perda da coordenação motora dos hospedeiros, inclusive fazendo com que estes parem de se alimentar (BIDOCHKA et al., 1997; VEY et al., 2002), ocasionando sua morte 4 ou 5 dias depois da infecção (SHAH & PELL, 2003). Após a morte, as hifas se desenvolvem e invadem os órgãos internos em busca de nutrientes. Com o esgotamento destes nutrientes, o processo de infecção termina e as hifas se estendem para fora do corpo do hospedeiro (Figura 2). Caso as condições ambientais sejam favoráveis, pode ocorrer a produção de esporos, que poderão infectar novos indivíduos (SILVA, 2005). Fungos artropodopatogênicos, como *M. anisopliae* e *B. bassiana*, possuem a capacidade de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar componentes proteicos, lipídicos e quitinosos presentes na cutícula dos hospedeiros artrópodes, garantindo assim a penetração

das hifas até atingir a hemolinfa do hospedeiro, rica em nutrientes (SANTI et al., 2010-a).

2.4 Enzimas presentes no processo de infecção

Algumas enzimas potencialmente relacionadas com a virulência de *M. anisopliae* foram caracterizadas através de técnicas clássicas de bioquímica e biologia molecular (ST LEGER et al., 1996; SILVA et al., 2005; WANG & ST LEGER, 2005; WANG & ST LEGER, 2007). Atualmente, abordagens proteômicas vêm sendo adotadas a fim de confirmar o papel destas enzimas no processo de infecção e no reconhecimento de hospedeiros, além de identificar outras proteínas participantes destes processos em *M. anisopliae* (SANTI et al., 2010-b; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

As proteases são consideradas fundamentais para o processo de infecção de *M. anisopliae*, por participarem ativamente da hidrólise da porção protéica da cutícula. Em um modelo de infecção, pelo menos 14 isoformas de proteases foram detectadas por zimogramas (ST LEGER et al., 1998). Dentre as diversas proteases produzidas por *M. anisopliae*, as subtilisinas estão em maior número (Pr1A-Pr1K) (BAGGA et al., 2004). Porém, quando relacionadas diretamente com a infecção, apenas a protease Pr1A foi validada experimentalmente (ST LEGER et al., 1996). Além das subtilisinas, *M. anisopliae* secreta outras classes de proteases, incluindo as tipo tripsina (Pr2) (GILLESPIE et al., 1998), tipo quimotripsina (SCREEN & ST LEGER, 2000), cisteíno-proteases (Pr4, podendo ser uma isoforma de Pr2) (COLE et al., 1993), carboxipeptidases (JOSHI & ST LEGER, 1999) e metaloproteases (ST LEGER et al., 1994). Recentemente, 5 membros da classe das subtilisinas foram identificadas no secretoma de *M. anisopliae* quando infectando uma praga do algodão (BEYS-DA-SILVA et al., 2014), evidenciando, mais uma vez, a importância destas enzimas no biocontrole.

As quitinases são outra classe de hidrolases com possível ação sobre a cutícula dos artrópodes, rica em quitina. Em fungos, as quitinases auxiliam na aquisição de nutrientes, na modificação da quitina da parede celular, na liberação

dos esporos, na diferenciação e na morfogênese de hifas (SANTI, 2009). Além disso, como descrito para outros fungos patogênicos, possivelmente desempenham a função de virulência. Especificamente para *M. anisopliae*, em trabalhos anteriores, pelo menos seis diferentes quitinases foram observadas em culturas com cutícula de carrapato e, destas, uma foi detectada por imunolocalização, participando ativamente da infecção (SILVA et al., 2005). Portanto, assim como as proteases, as quitinases parecem atuar como importantes enzimas para transpor a cutícula dos artrópodes, sendo fundamentais para o sucesso da patogênese.

Outra classe de enzimas relacionadas com a fase inicial de penetração são as lipases (BEYS DA SILVA et al., 2010-a; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Estas enzimas foram detectadas durante as primeiras seis horas de infecção e na superfície de esporos (SANTI et al., 2010-a), sendo, sua atividade, sugerida como crucial para o desencadear de todo o processo infectivo (BEYS DA SILVA et al., 2010-a). Foi observado que o controle efetivo do carrapato *R. microplus*, bem como a secreção de lipases durante o processo de infecção, foram afetados quando a atividade da lipase foi bloqueada com um inibidor específico, comprovando a importância desta classe de enzimas no início do processo de infecção (BEYS DA SILVA et al., 2010-a). Recentemente, duas enzimas relacionadas com a degradação de lipídeos – lactonohidrolase e ceramidase – foram identificadas em secretoma de *M. anisopliae*. Estas duas enzimas são muito específicas, o que é importante, visto a alta complexidade lipídica encontrada em diferentes hospedeiros (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Portanto, enzimas lipolíticas seriam as primeiras a serem secretadas para penetração visto a composição da epicutícula dos artrópodes e de acordo com os resultados publicados anteriormente (BEYS DA SILVA et al., 2010-a).

Atualmente, a utilização de abordagens moleculares e proteômicas identificou outras proteínas envolvidas no processo de infecção de *M. anisopliae*, permitindo uma visão global da expressão e secreção de proteínas deste fungo frente a componentes estruturais dos seus hospedeiros. Com isso, diversas proteínas relacionadas com a detoxificação/proteção contra radicais livres (superóxido dismutases, catalases, peroxidases), com a aquisição de nutrientes da hemolinfa (trealase), sinalização (proteína G e fosfatases), entre outras, vêm sendo

identificadas (FREIMOSER et al., 2003; 2005; DUTRA et al., 2004; SANTI et al., 2009; SANTI et al., 2010-b; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

2.5 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Os carrapatos são aracnídeos e fazem parte da ordem Ixodida, sendo divididos em duas famílias principais: Ixodidae, composta pelos hard-ticks (carrapatos duros) e Argasidae, formada pelos soft-ticks (carrapatos moles), totalizando mais de 800 espécies (BARKER & MURRELL, 2004; BEYS DA SILVA et al., 2012). *R. microplus* pertence à família Ixodidae. Apresenta uma camada externa rígida, esclerotizada, de coloração cinza-escuro, que recobre o corpo (idiossoma) de forma parcial nas fêmeas e por completo nos machos (BEYS DA SILVA et al., 2012), estando entre os primeiros aracnídeos que habitaram a Terra, há cerca de 300 milhões de anos (MANS & NEITZ, 2004). É considerado monoxeno, realizando todas as mudas em um único hospedeiro.

Rhipicephalus microplus (CANESTRINI, 1887), é classificado como um ectoparasito hematófago de bovinos, originário da Ásia e bastante característico das regiões de clima tropical e subtropical, como América do Sul e Central, sul dos Estados Unidos, México, Ilhas do Caribe, Austrália e alguns países asiáticos (ESTRADA-PEÑA et al., 2006). Este carrapato apresenta um ciclo de vida dividido em duas fases: um parasitário, onde está em contato com o hospedeiro e um ciclo de vida no pasto ou de vida livre. O ciclo de vida parasitário inicia com as larvas infestantes entrando em contato com o hospedeiro, compreendendo a fase de larva até o carrapato se tornar adulto, o que leva cerca de 21 dias, sendo que só as fêmeas do carrapato se alimentam de sangue (BEYS DA SILVA et al., 2012; VERÍSSIMO, 2013). Geralmente, no 22º dia do ciclo, as teleóginas (fêmeas ingurgitadas) se desprendem do hospedeiro e caem no chão, iniciando o ciclo de vida livre. Assim que atingem o solo, as fêmeas procuram um local úmido e protegido da luz solar para realizar a oviposição, sendo que cada uma é capaz de colocar, em média, 3.000 ovos. Suas larvas apresentam uma região sensorial específica (órgão de Haller) no primeiro par de patas, responsável por sentir e reconhecer a aproximação do hospedeiro ideal. Através do olfato, as larvas são

atraídas pela secreção da pele e gases da expiração do gado bovino, bem como, pelo odor de suas fezes (VERÍSSIMO, 2013). Sabe-se que as condições climáticas podem influenciar os estágios de vida livre de *R. microplus*, sendo que em baixas temperaturas, o tempo entre o desprendimento do hospedeiro e o surgimento das larvas pode demorar mais de 6 meses (BEYS DA SILVA et al., 2012), enquanto que o calor acelera este processo. A umidade também pode interferir na fase de vida livre, prejudicando o período de embriogênese, caso esteja muito baixa, quando o ideal para este período seria de 80% de umidade relativa (VERÍSSIMO, 2013). É importante salientar que cerca de 95% dos carrapatos é encontrada livre no ambiente, seja na forma de larva ou como fêmeas adultas (BEYS DA SILVA et al., 2012; VERÍSSIMO, 2013).

Infestações causadas por *R. microplus* podem causar grandes prejuízos econômicos aos pecuaristas, além dos danos à saúde dos animais, devido à grande quantidade de sangue que retira destes. Em média, cada carrapato suga de 2 a 3 mL de sangue por dia, ocasionando anemia, entre outras alterações orgânicas, como anorexia, apatia, redução na produção de leite, podendo levar o animal a morte (JONSSON, 2006; WEBSTER et al., 2015). Além disso, a picada do carrapato pode causar desconforto, prurido, inflamações, infecções secundárias, facilitando a ocorrência de miíases, podendo danificar tecidos, devido a toxicidade desencadeada pela inoculação de substâncias presentes em sua saliva (LEAL et al., 2003; BEYS DA SILVA et al., 2012). Além disso, os carrapatos podem atuar como vetores de algumas doenças, tais como a tristeza bovina, causada por protozoários e bactérias dos gêneros *Babesia*, *Rickettsia* e *Anaplasma* (LEAL et al., 2003; ESTRADA-PEÑA et al., 2006; RECK et al., 2009). Estes parasitas podem também alterar os parâmetros bioquímicos do sangue, bem como as funções renais e digestivas do hospedeiro (RECK et al., 2009; BEYS DA SILVA et al., 2012). Há relatos de que as perdas econômicas no Brasil causadas por infestações de *R. microplus* chegam a US \$ 3,2 bilhões de dólares por ano, devido à perda de peso, custos com acaricidas, diminuição da produção de leite e carne, baixa qualidade do couro, além de custos no tratamento das miíases (BEYS DA SILVA et al., 2012; GRISI et al., 2014).

Da mesma forma como acontece com outros artrópodes-praga, o carrapato é controlado pelo uso de produtos químicos, em estratégias que acabam acarretando

resistência, especialmente em regiões com alta incidência deste artrópodo. Estudos realizados por Mendes et al. (2011), mostraram que o controle do carrapato, quando feito com a utilização de acaricidas químicos aplicados mais do que 6 vezes em um ano, pode contribuir para o desenvolvimento de populações resistentes a estes produtos. Atualmente, no RS, já existem cepas de carrapato resistentes aos acaricidas químicos disponíveis comercialmente. Apesar de ser eficiente, os métodos de controle químico são alvo de críticas frequentes, devido também a questões relacionadas com os custos e possíveis resíduos químicos que poderiam ficar no leite e carne utilizados para consumo humano. Assim, medidas alternativas de controle estão recebendo cada vez mais atenção, com resultados promissores (BEYS DA SILVA et al., 2012; WEBSTER et al., 2015).

2.6 Proteômica

A proteômica é o estudo global das proteínas presentes em uma célula ou tecido ou organismo em uma determinada condição ou momento, sendo altamente variável. Os avanços tecnológicos nesta área estão se expandindo de maneira promissora nos últimos tempos, pois novas tecnologias como a espectrometria de massas, *softwares* e ferramentas de bioinformática têm tornado a identificação destas proteínas possível (QUIRINO et al., 2010). A proteômica tem se destacado atualmente como uma ferramenta extremamente importante na descoberta de proteínas envolvidas em diversos processos, desde fisiopatologias, localização subcelular de diferentes proteínas, interações proteína-proteína, modificações pós-traducionais e relacionadas à interação patógeno-hospedeiro. Especificamente para o fungo *M. anisopliae*, alguns trabalhos vêm sendo realizados utilizando géis bidimensionais e imunoproteômica (MURAD et al., 2008; SANTI et al., 2009; SANTI et al., 2010-b). Porém, devido a limitações das técnicas, poucas proteínas foram identificadas. Mais recentemente, ao aplicar novas metodologias proteômicas, Beysda-Silva et al. (2014), conseguiram identificar 71 proteínas diferencialmente expressas sob condições de infecção entre o fungo *M. anisopliae* e o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus*, sendo que a maior parte destas proteínas não haviam sido detectadas em estudos anteriores.

Dessa forma, com o intuito de obter-se uma identificação global de proteínas secretadas pelo fungo em condição de ativação artificial do sistema de infecção, induzido pela presença da cutícula do carrapato, o presente trabalho utilizou a técnica de MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) que, a partir de uma amostra complexa, é capaz de identificar proteínas, inclusive de baixa abundância, obtendo informações bioquímicas detalhadas (WASHBURN et al., 2001). Desta maneira é possível identificar proteínas diferencialmente expressas, que ainda não foram detectadas em outras análises proteômicas (BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Metarhizium anisopliae*

3.1.1 Em arroz

As suspensões de conídios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, isolado E6, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Augusto Schrank, foram obtidas cultivando o fungo em sacos plásticos transparentes (15x25 cm) contendo 100 gramas de arroz branco tipo 1 contendo 30 mL de peptona 0,5%. Os sacos foram então amarrados com cordões e autoclavados por 15 minutos, em temperatura de 121 °C. Após, 1 mL de solução de conídios de *M. anisopliae* com concentração de 1×10^6 conídios/mL foi inoculada em cada saco, os quais foram então mantidos em estufa à temperatura de 28 °C até a esporulação.

3.1.2 Suspensão de esporos

A suspensão líquida utilizada nos bioensaios foi obtida através da lavagem do arroz contendo o fungo esporulado com água MilliQ estéril. Cada suspensão foi checada quanto a sua possível contaminação através do inóculo de 10 µL da mesma em 3 mL de meio LB líquido (20h, 37 °C). As concentrações das suspensões foram determinadas e ajustadas, quando necessário, para chegar a uma concentração de 1×10^8 conídios/mL.

3.1.3 Em meio líquido

Conforme protocolo já testado por Beys da Silva e colaboradores (2014), suspensões de conídios (10^7 mL^{-1}) foram inoculados em 70 mL de meio basal (0,6% NaNO_3 , 0,2% glicose, 0,2% peptona, 0,05% extrato de levedura) contendo 0,05% estereato de colesteril e 0,7% cutícula de *R. microplus* (RM) (como condição artificial de infecção) ou 1% glicose (G) (como condição controle). Os frascos foram incubados a 28 °C com agitação (150 rpm) por 48 h. Transcorrido o tempo, 0,25% (v/v) Triton X-100 foi adicionado ao frasco e manualmente misturado para extração das proteínas. O sobrenadante foi separado por filtração e fervido por 15 min para inativação das proteases, seguido por congelamento a -80 °C e liofilização. As culturas foram realizadas em triplicata com 3 replicatas biológicas.

3.2 Preparação das cutículas de carrapato

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram esmagadas para remoção do conteúdo interno. As cutículas foram lavadas diversas vezes com água destilada estéril e esterilizadas por autoclavagem antes do uso.

3.3 Quantificação das proteínas

O sobrenadante liofilizado foi ressuscitado em um pequeno volume de água purificada (JTBaker, USA) e precipitado, para remoção do detergente utilizado na extração, através do método metanol/clorofórmio. Após a precipitação, as amostras foram secas a 37 °C e novamente ressuscitadas em água purificada. A concentração de proteínas destas amostras foi determinada pelo método de BCA (Pierce, Rockford, IL), utilizando albumina bovina como padrão.

3.4 Preparação da amostra para espectrometria

Aproximadamente 100 µg das proteínas secretadas de *M. anisopliae* em meio contendo cutícula de carrapato ou glicose, tratadas como descrito acima, foram ressuspendidas em tampão de digestão (8 M ureia, 100 mM tris-HCl pH 8,5). As proteínas foram reduzidas com 5 mM tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) por 20 min a temperatura ambiente, e alquiladas com 10 mM iodoacetamida por 15 min a temperatura ambiente e abrigo da luz. Após a adição de 1 mM CaCl₂, as proteínas foram digeridas com 2 µg de tripsina (Promega, Madison, WI) e incubadas a 37 °C, 16 h. A proteólise foi interrompida adicionando-se ácido fórmico a uma concentração final de 5% (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). As amostras foram centrifugadas (14.000 rpm, 20 min) e o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C. O experimento foi realizado em triplicata. Na preparação das amostras para proteômica, as triplicatas das culturas foram agrupadas em *pools* (cada triplicata foi agrupada e realizada duas corridas de espectrometria, totalizando 6 corridas/condição).

3.5 Espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos foram carregados em colunas previamente empacotadas para MudPIT (contendo 2,5 cm de resina de troca iônica e 2 cm de resina para fase reversa), conforme descrito por Beys-da-Silva et al. (2014). Os peptídeos foram separados em uma coluna de 11 cm (fase reversa) e analisados em espectrômetro de massas do tipo LTQ-XL (Thermo Finnigan, Palo Alto, CA) com 12 passos de separação com diferentes concentrações de sal (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Os tampões utilizados foram os seguintes: tampão A (5% acetonitrila/0,1% ácido fórmico), tampão B (80% acetonitrila/0,1% ácido fórmico) e tampão C (500 mM acetato de amônio, 5% acetonitrila/0,1% ácido fórmico). A identificação de proteínas e análises de quantificação foram feitas utilizando o site Integrated Proteomics Pipeline (IP2, www.integratedproteomics.com/). A busca para identificação das proteínas foi realizada contra o banco de dados contendo o genoma de *M. anisopliae* ARSEF23 (STAATS et al., 2014), isolado E6, usado neste trabalho, disponível no NCBI.

3.6 Análises de bioinformática

O software PatternLab foi utilizado para identificar proteínas diferencialmente expressas (módulo TFold) ou exclusivas (módulo AAPV) das condições analisadas. Para as proteínas diferencialmente expressas foram utilizados os seguintes parâmetros: proteínas que não foram detectadas em, pelo menos, 4 das 6 corridas por condição foram desconsideradas; $p \leq 0,005$; e *fold change* maior ou igual a 2. (BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A patogenicidade de *M. anisopliae* está correlacionada com a sua capacidade de secretar diversas enzimas, toxinas e metabólitos secundários (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010). Este fenômeno é complexo e multifatorial, devido a determinados fatores de virulência que aparecem nos diferentes estágios do processo de infecção até a morte de seu hospedeiro alvo. Como acontece com a maioria dos fungos artropodopatogênicos, *M. anisopliae* utiliza uma combinação de enzimas para penetrar a cutícula e se beneficiar da hemolinfa, rica em nutrientes, além dos tecidos presentes na hemocele (MANALIL et al., 2010).

A avaliação do perfil de proteínas secretadas por patógenos microbianos sob condições artificiais de infecção é uma estratégia válida, capaz de revelar os componentes possivelmente responsáveis pelo sucesso da infecção do hospedeiro. Neste trabalho, utilizando *shotgun proteomics*, ou seja, a identificação de proteínas em larga escala, avaliamos o secretoma de *M. anisopliae* em condições que mimetizam a infecção utilizando como hospedeiro o carrapato bovino *R. microplus*.

Estudos anteriores vêm mostrando que *M. anisopliae* secreta uma diversidade de proteínas com funções específicas durante o processo de infecção de seus hospedeiros. Neste trabalho foram observadas diferenças significativas no secretoma do fungo induzidas pela exposição à cutícula de *R. microplus*, em comparação a uma condição de controle (glicose) durante o período de 48 horas. Como observado no diagrama de Venn (Figura 3), um total de 404 proteínas foram identificadas, sendo que 33% (133) foram exclusivas da condição de infecção. Das

266 proteínas identificadas em ambas as condições, 56 foram diferencialmente expressas com uma diferença de, pelo menos, duas vezes.

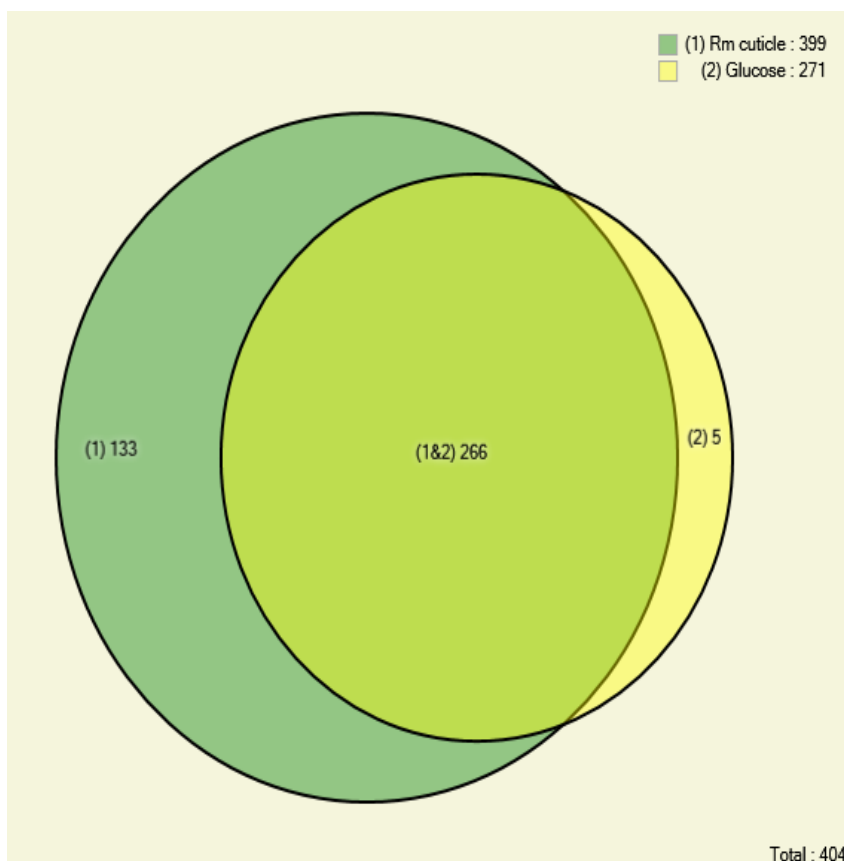


Figura 3: Distribuição e sobreposição de proteínas do secretoma de *M. anisopliae* quando crescido em meio contendo cutícula de *R. microplus* após 48h comparado com o controle (glicose). Os dados foram gerados no módulo AAPV do programa PatternLab. Círculo verde: Condição artificial de infecção; círculo amarelo: Condição controle.

Proteínas importantes relacionadas com a degradação de componentes da cutícula (proteases, lipases e quitinases), com a resistência a radiação UV (tirosinase) e com a adesão (proteínas do tipo adesina e fosfatases) foram identificadas exclusivamente no secretoma que mimetizava uma condição de infecção (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas exclusivamente identificadas no secretoma de *M. anisopliae* quando cultivado por 48 horas em condição artificial de infecção do carrapato *R. microplus*.

Nº de acesso e locus	Nome da proteína (descrição)	Spec Count *
gi 672383843 gb KFG85949.1	hypothetical protein MANI_011377	544
gi 672383272 gb KFG85387.1	ThiJ/Pfpl family protein	381
gi 672378206 gb KFG80457.1	ER membrane protein Wsc4	272
gi 672380791 gb KFG82986.1	hypothetical protein MANI_021357	238
gi 672376434 gb KFG78725.1	carboxypeptidase	210
gi 672382737 gb KFG84858.1	hypothetical protein MANI_022411	201
gi 672377000 gb KFG79277.1	subtilisin-like protease PR1G	127
gi 672379708 gb KFG81918.1	chitooligosaccharide oxidase	115
gi 672384636 gb KFG86731.1	cell wall protein	106
gi 672385928 gb KFG88014.1	putative galactose oxidase, partial	94
gi 672382595 gb KFG84717.1	putative cutinase	94
gi 672383956 gb KFG86059.1	endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase D1 (chitinase)	75
gi 672379284 gb KFG81500.1	carboxypeptidase	70
gi 672381594 gb KFG83774.1	aminopeptidase 2	64
gi 672378348 gb KFG80590.1	hypothetical protein MANI_119609	60
gi 672378126 gb KFG80381.1	hypothetical protein MANI_011023	60
gi 672377593 gb KFG79861.1	putative dioxygenase	53
gi 672378083 gb KFG80338.1	hypothetical protein MANI_010921	51
gi 672384941 gb KFG87032.1	putative cellulase	48
gi 672376628 gb KFG78916.1	subgroup A chitinase A1	48
gi 672375320 gb KFG77657.1	TRI14-like protein	48
gi 672380790 gb KFG82985.1	alpha/beta-hydrolase	47
gi 672381730 gb KFG83907.1	profilin	46
gi 672381209 gb KFG83398.1	hypothetical protein MANI_018182	46
gi 672383805 gb KFG85912.1	hypothetical protein MANI_011448	45
gi 672385181 gb KFG87270.1	Lcc2	44
gi 672383931 gb KFG86035.1	putative aminopeptidase	43
gi 672377748 gb KFG80013.1	hypothetical protein MANI_019648	42
gi 672380686 gb KFG82883.1	Citrate synthase	41
gi 672377598 gb KFG79866.1	acetylcholinesterase precursor	40
gi 672385773 gb KFG87860.1	6-phosphogluconate dehydrogenase	38
gi 672385160 gb KFG87250.1	hypothetical protein MANI_022892	36
gi 672376835 gb KFG79118.1	putative serine peptidase	36

Continua:

Nº de acesso e locus	Nome da proteína (descrição)	Spec Count *
gi 672375499 gb KFG77823.1	glucose-6-phosphate isomerase	35
gi 672382664 gb KFG84786.1	hypothetical protein MANI_010159	34
gi 672384382 gb KFG86479.1	transaldolase	33
gi 672377114 gb KFG79389.1	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel2	31
gi 672383117 gb KFG85233.1	elongation factor 1-gamma	30
gi 672382899 gb KFG85018.1	tyrosinase 2	29
gi 672378963 gb KFG81188.1	Subtilisin-like protease PR1H	29
gi 672378426 gb KFG80666.1	hypothetical protein MANI_017731	29
gi 672375020 gb KFG77467.1	subtilisin-like serine protease	29
gi 672380299 gb KFG82505.1	NADP-dependent glycerol dehydrogenase	28
gi 672376736 gb KFG79021.1	adhesin-like protein 1, partial	28
gi 672384663 gb KFG86758.1	spermidine synthase	26
gi 672379653 gb KFG81867.1	extracellular cell wall glucanase Crf1	26
gi 672385963 gb KFG88048.1	putative alpha/beta fold family hydrolase	25
gi 672382772 gb KFG84893.1	hypothetical protein MANI_115390	24
gi 672382606 gb KFG84728.1	hypothetical protein MANI_010251	24
gi 672382448 gb KFG84574.1	mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase	23
gi 672379036 gb KFG81258.1	ECM33-like protein	23
gi 672377796 gb KFG80060.1	metallo-endopeptidase	23
gi 672383659 gb KFG85768.1	Complex I intermediate-associated protein 30	22
gi 672375422 gb KFG77749.1	hypothetical protein MANI_005297	22
gi 672379453 gb KFG81668.1	hypothetical protein MANI_019335	21
gi 672378993 gb KFG81215.1	putative endoglucanase	21
gi 672382282 gb KFG84413.1	outer membrane protein porin	20
gi 672377130 gb KFG79405.1	alanine--glyoxylate aminotransferase	19
gi 672375552 gb KFG77873.1	hypothetical protein MANI_004329	19
gi 672385878 gb KFG87964.1	putative antigenic cell wall galactomannoprotein	18
gi 672382980 gb KFG85097.1	hypothetical protein MANI_002202	18
gi 672381720 gb KFG83897.1	mannan endo-1,6-alpha-mannosidase-like protein	18
gi 672383519 gb KFG85631.1	translation elongation factor 1 alpha	17
gi 672382815 gb KFG84935.1	putative serine-threonine rich protein	17
gi 672382148 gb KFG84282.1	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D	17
gi 672376333 gb KFG78628.1	Cel5b putative endoglucanase	17
gi 672385923 gb KFG88009.1	proteinase inhibitor I4	16
gi 672379235 gb KFG81454.1	subtilisin-like serine protease PR1C	16
gi 672378469 gb KFG80706.1	hypothetical protein MANI_111186	16
gi 672375493 gb KFG77817.1	hypothetical protein MANI_004456	15

Continuação:

Nº de acesso e locus	Nome da proteína (descrição)	Spec Count *
gi 672381383 gb KFG83567.1	putative endoglucanase	14
gi 672375782 gb KFG78097.1	neutral ceramidase precursor	14
gi 672381865 gb KFG84031.1	glutathione-disulfide reductase	13
gi 672380515 gb KFG82719.1	Secretory lipase family protein	13
gi 672380467 gb KFG82671.1	malate dehydrogenase	13
gi 672377540 gb KFG79808.1	metalloprotease-like protein	13
gi 672375604 gb KFG77924.1	Subgroup B chitinase B4	13
gi 672382275 gb KFG84406.1	hypothetical protein MANI_010825	12
gi 672377590 gb KFG79858.1	proline rich protein 5MeD	12
gi 672384869 gb KFG86962.1	alcohol dehydrogenase	11
gi 672383917 gb KFG86022.1	putative phospholipase	11
gi 672383753 gb KFG85861.1	hypothetical protein MANI_027536	11
gi 672383580 gb KFG85690.1	arginine deiminase type-3	11
gi 672383290 gb KFG85405.1	hypothetical protein MANI_005023	11
gi 672378896 gb KFG81125.1	hypothetical protein MANI_014530	11
gi 672377571 gb KFG79839.1	hypothetical protein MANI_008919	11
gi 672384303 gb KFG86401.1	hypothetical protein MANI_002345	10
gi 672383541 gb KFG85652.1	hypothetical protein MANI_004698	10
gi 672383011 gb KFG85128.1	secreted aspartic proteinase	10
gi 672381667 gb KFG83846.1	hypothetical protein MANI_027043	10
gi 672380646 gb KFG82843.1	putative extracellular protein	10
gi 672383668 gb KFG85777.1	outer membrane autotransporter	9
gi 672383383 gb KFG85496.1	regulatory P domain-containing protein	9
gi 672383174 gb KFG85290.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	9
gi 672380281 gb KFG82487.1	putative glycosyl hydrolase	9
gi 672377234 gb KFG79508.1	metalloprotease MEP1	9
gi 672376413 gb KFG78705.1	candidapepsin-4 precursor	9
gi 672375620 gb KFG77940.1	hypothetical protein MANI_004425	9
gi 672375241 gb KFG77583.1	putative restculine oxidase precursor	9
gi 672383898 gb KFG86003.1	hypothetical protein MANI_010408	8
gi 672383827 gb KFG85933.1	hypothetical protein MANI_004014	8
gi 672383679 gb KFG85788.1	hypothetical protein MANI_007526	8
gi 672383358 gb KFG85471.1	alpha-galactosidase	8
gi 672379239 gb KFG81458.1	galactose oxidase precursor	8
gi 672378833 gb KFG81062.1	isoflavone reductase family protein	8
gi 672378802 gb KFG81031.1	formate dehydrogenase	8
gi 672377760 gb KFG80025.1	putative Xaa-Pro aminopeptidase pepP	8

Conclusão:

Nº de acesso e locus	Nome da proteína (descrição)	Spec Count *
gi 672377093 gb KFG79368.1	cell surface protein (Mas1)	8
gi 672376632 gb KFG78920.1	hypothetical protein MANI_007473	8
gi 672385701 gb KFG87788.1	alpha/beta hydrolase fold domain containing protein	7
gi 672385664 gb KFG87751.1	hypothetical protein MANI_001032	7
gi 672384157 gb KFG86257.1	major allergen Asp f 2-like protein	7
gi 672381305 gb KFG83494.1	adhesin-like protein 1, partial	7
gi 672377990 gb KFG80248.1	Alpha-N-arabinofuranosidase Precursor	7
gi 672377374 gb KFG79646.1	hypothetical protein MANI_019146	7
gi 672377235 gb KFG79509.1	putative cell surface spherulin 4-like protein	7
gi 672376253 gb KFG78550.1	hypothetical protein MANI_002983	7
gi 672381673 gb KFG83852.1	Leukotriene A-4 hydrolase	6
gi 672378081 gb KFG80336.1	hypothetical protein MANI_010995	6
gi 672377798 gb KFG80062.1	ThiJ/Pfpl family protein	6
gi 672386154 gb KFG88237.1	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	5
gi 672384745 gb KFG86839.1	beta-glucosidase	5
gi 672381709 gb KFG83886.1	hypothetical protein MANI_116252	5
gi 672381296 gb KFG83485.1	extracellular serine-rich protein	5
gi 672380947 gb KFG83141.1	putative WSC domain protein	5
gi 672380127 gb KFG82333.1	putative nuclease PA3	5
gi 672378815 gb KFG81044.1	hypothetical protein MANI_014475	5
gi 672378560 gb KFG80795.1	collagen-like protein Mcl1	5
gi 672376341 gb KFG78636.1	hypothetical protein MANI_002826	5
gi 672375992 gb KFG78299.1	hypothetical protein MANI_020368	5
gi 672384220 gb KFG86320.1	hypothetical protein MANI_009105	4
gi 672382616 gb KFG84738.1	putative ferulic acid esterase (FaeA)	4
gi 672375342 gb KFG77678.1	hypothetical protein MANI_016460	4

* Spec Count – *Spectral count*, número total de espectros identificados, medida de abundância da proteína na amostra.

Além disso, quando avaliadas as proteínas diferencialmente expressas em ambas as condições, proteínas envolvidas com a degradação de componentes da hemolinfa (trealase) e cutícula (proteases), proteção contra estresse oxidativo (tioredoxina) e sinalização (tirosina fosfatase), foram reguladas positivamente quando o fungo foi cultivado na presença da carapaça do carrapato, ativando o sistema de infecção (Tabela 2). Apenas quatro proteínas apresentaram expressão diminuída na mesma condição: duas ribonucleases e duas proteínas hipotéticas (Tabela 2).

Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *M. anisopliae* quando cultivado por 48 horas em condição artificial de infecção do carrapato *R. microplus* quando comparado ao controle (glicose).

Nº de acesso e locus	Fold Change	Valor de p	Nome da proteína
gi 672381981 gb KFG84128.1	75.71857923	1.00E-05	subtilisin-like protease PR1K
gi 672378997 gb KFG81219.1	74.8015873	0.000721005	riboflavin aldehyde-forming enzyme
gi 672378772 gb KFG81001.1	54.5625	0.000191149	putative effector 14
gi 672380759 gb KFG82955.1	31.66666667	0.000607485	Subgroup A chitinase A6
gi 672380312 gb KFG82517.1	27.31944444	0.003244297	trypsin-related protease
gi 672383693 gb KFG85802.1	24.90509259	0.031737742	1,2-a-D-mannosidase
gi 672375501 gb KFG77825.1	24.4	0.004165984	hypothetical protein MANI_004468
gi 672384717 gb KFG86811.1	22.88304094	0.000281884	WSC domain containing protein
gi 672376542 gb KFG78830.1	22.88095238	0.003841831	putative thioredoxin reductase
gi 672380302 gb KFG82508.1	20.91666667	1.00E-05	carboxy-cis,cis-muconate cyclase
gi 672376342 gb KFG78637.1	20.25333333	0.006996017	TRI14-like protein
gi 672381881 gb KFG84047.1	20.0625	0.000706334	CFEM domain containing protein
gi 672383750 gb KFG85858.1	19.57407407	0.000559651	putative acid phosphatase
gi 672378164 gb KFG80416.1	18.76190476	0.001502208	subgroup B chitinase B7
gi 672375398 gb KFG77728.1	16.55769231	0.000831715	hypothetical protein MANI_005253
gi 672383059 gb KFG85176.1	15.79816514	0.015286951	secreted protein
gi 672385215 gb KFG87304.1	14.73333333	1.00E-05	beta-1,3-glucanase precursor
gi 672375490 gb KFG77814.1	14.49122807	1.92E-05	putative penicillin-binding protein

Continua:

Nº de acesso e locus	Fold Change	Valor de p	Nome da proteína
gi 672384588 gb KFG86683.1	13.02424242	0.00023715	subtilisin-like protease Pr1A
gi 672385451 gb KFG87539.1	10.73170732	0.029076998	hypothetical protein MANI_001730
gi 672382702 gb KFG84823.1	10.63207547	1.00E-05	alpha-glucosidase, partial
gi 672375566 gb KFG77887.1	10.25294118	0.002005488	cell wall protein
gi 672382950 gb KFG85069.1	9.560185185	0.001469935	endonuclease/exonuclease/ phosphatase family protein
gi 672382099 gb KFG84234.1	9.542735043	0.000333323	Cel3b putative secreted beta- glucosidase
gi 672378086 gb KFG80341.1	9.158333333	0.002092821	acid trehalase
gi 672375616 gb KFG77936.1	9.097378277	1.24E-05	putative non-hemolytic phospholipase C precursor
gi 672382585 gb KFG84709.1	8.434782609	0.00500367	putative GPI anchored protein
gi 672385232 gb KFG87321.1	7.590196078	0.001280665	beta-1,3-glucanosyltransferase
gi 672382220 gb KFG84351.1	6.967228464	0.015959113	GPI-anchored cell wall beta-1,3- endoglucanase EglC
gi 672379028 gb KFG81250.1	6.948148148	0.003425832	hypothetical protein MANI_024182
gi 672376523 gb KFG78811.1	6.422330097	0.002582521	hypothetical protein MANI_007455
gi 672378681 gb KFG80912.1	6.319444444	0.008319856	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A
gi 672375358 gb KFG77692.1	6.248858447	1.89E-05	protein tyrosine phosphatase
gi 672379163 gb KFG81383.1	5.933333333	0.000239942	malate dehydrogenase
gi 672380754 gb KFG82950.1	5.6875	0.002216533	hypothetical protein MANI_022604
gi 672379705 gb KFG81915.1	5.484893512	3.99E-05	hypothetical protein MANI_000861

Continuação:

Nº de acesso e locus	Fold Change	Valor de p	Nome da proteína
gi 672385369 gb KFG87457.1	5.115740741	1.00E-05	putative glyoxal oxidase precursor
gi 672385526 gb KFG87613.1	5.090909091	1.00E-05	hypothetical protein MANI_001481
gi 672376244 gb KFG78542.1	4.931034483	0.000854636	putative cell wall glycosyl hydrolase YteR, partial
gi 672378859 gb KFG81088.1	4.877873563	0.000869238	DNase1 protein
gi 672376005 gb KFG78310.1	4.567264574	0.010476653	GPI-anchored cell wall beta-1,3-endoglucanase EglC
gi 672383910 gb KFG86015.1	3.837037037	2.00E-05	phosphorylcholine phosphatase
gi 672383228 gb KFG85344.1	3.823002755	0.036081882	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein
gi 672381896 gb KFG84062.1	3.809895833	1.00E-05	5'-nucleotidase precursor
gi 672384190 gb KFG86290.1	3.761904762	4.38E-05	nucleoside diphosphate kinase 1
gi 672375617 gb KFG77937.1	3.74906367	0.001218451	putative leucine aminopeptidase
gi 672378520 gb KFG80755.1	3.362421384	0.023823123	putative glucose oxidase
gi 672384737 gb KFG86831.1	2.683333333	0.000595794	tripeptidyl-peptidase 1 precursor
gi 672384654 gb KFG86749.1	2.468599034	0.025026251	hypothetical protein MANI_113561
gi 672385419 gb KFG87507.1	2.389397407	0.02273437	acid phosphatase
gi 672375619 gb KFG77939.1	2.06698821	0.001490895	beta-1,6-glucanase
gi 672382503 gb KFG84628.1	2.035037879	0.030875283	hypothetical protein MANI_019971
gi 672377834 gb KFG80097.1	-2.32781954	0.0008707	Ribonuclease Trv
gi 672376381 gb KFG78674.1	-3.73675762	0.000234792	Guanyl-specific ribonuclease F1

Conclusão:			
Nº de acesso e locus	Fold Change	Valor de p	Nome da proteína
gi 672385099 gb KFG87189.1	-5.01382488	7.10E-05	hypothetical protein MANI_000444
gi 672384426 gb KFG86522.1	-20.4761904	0.000575519	hypothetical protein MANI_013783

(+) *fold change* - proteína regulada positivamente em meio contendo cutícula.

4.1 Enzimas de degradação de cutícula

Enzimas que degradam a cutícula dos hospedeiros favorecem a penetração e são fundamentais para o avanço da infecção, sendo uma das principais vantagens dos patógenos (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Consistente com isto, proteases, quitinases e lipases são fundamentais para transpor a carapaça do carrapato, disponibilizando nutrientes para o crescimento do fungo. Aqui, três diferentes classes de proteases foram identificadas: serino, metalo e aspártico proteases. Para *M. anisopliae*, a família das serino-proteases do tipo subtilisina (Pr1) são as mais abundantes e bem estudadas (BAGGA et al., 2004), podendo influenciar na virulência e especificidade do hospedeiro (SANTI et al., 2010-a; MANALIL et al., 2010; BEYS-DA-SILVA et al., 2012). Entre estas, três diferentes isoformas foram identificadas unicamente quando o fungo foi cultivado em cutícula: Pr1C, Pr1H e Pr1G, e duas reguladas positivamente (Pr1K, com um *fold change* de mais de 75 vezes; Pr1A, com *fold change* de mais de 24 vezes), quando comparada com o controle (glicose). Pr1K foi identificada previamente com aumento na expressão (a nível de mRNA) durante a infecção em *Manduca sexta* após 8h de infecção (FREIMOSER et al., 2005). Pr1A foi previamente detectada em outros estudos proteômicos com diferentes hospedeiros, incluindo *D. peruvianus* (BEYS-DA-SILVA et al., 2014) e *R. microplus* (SANTI et al., 2009), o que leva a crer que esta isoforma de Pr1 está relacionada com a infecção de maneira geral, e não com a especificidade ao hospedeiro. Isto corrobora com dados anteriores, onde Pr1A foi predominante na degradação da cutícula, sendo uma das primeiras proteases a ser secretada (ST LEGER et al., 1989; BAGGA et al., 2004; FREIMOSER et al., 2005).

Interessantemente, Pr1C, identificada exclusivamente no secretoma de infecção, foi também identificada em um trabalho de RDA (análise de representação diferencial), onde seus níveis de RNA estavam superexpressos em cultura mimetizando a infecção em *R. microplus* (DUTRA et al., 2004). Quando avaliada previamente em um interatoma, esta enzima ocupou uma função central na interação proteína-proteína, podendo ser relevante para o sistema como um todo (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Juntamente com as Pr1, as proteases do tipo tripsina, ou Pr2, detectadas positivamente reguladas na condição infectiva, são importantes para transpor a barreira do hospedeiro. A atividade da tripsina pode ser complementar à Pr1, desencadeando uma cascata de reações que facilitam a penetração do fungo na cutícula do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1996; MANALIL et al., 2010).

Outra classe de enzimas envolvidas com a patogenicidade são as quitinases, importantes para degradar a porção quitinosa da carapaça dos artrópodes. O metabolismo da quitina em fungos está envolvido em vários processos, como a manutenção da parede celular metabolicamente ativa, nutrição básica e nos mais variados aspectos de virulência, sendo um componente essencial da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes. Algumas quitinases estão envolvidas em atividades estruturais, morfogênicas, autolíticas e nutricionais em células fúngicas. As quitinases são importantes nas interações patogênicas, degradando o conteúdo de quitina na cutícula de artrópodes, podendo ser identificada em secreções extracelulares de *M. anisopliae* e potencialmente consideradas fatores de virulência (SANTI et al., 2009). Neste trabalho estas enzimas foram identificadas tanto reguladas positivamente, quanto exclusivas quando o fungo foi exposto à cutícula de carrapato. Provavelmente estas enzimas atuem sinergisticamente com as proteases para solubilizar a cutícula do hospedeiro durante a penetração (SANTI, 2009). Em outros fungos entomo- e fitopatogênicos (*B. bassiana* e *Trichoderma harzianum*, respectivamente), as quitinases também desempenham a função de virulência (CARSOLIO et al., 1999; FANG et al., 2005). Em culturas de *M. anisopliae* contendo carapaça de carrapato, pelo menos 6 quitinases já foram detectadas. Uma destas (CHIT30), apresentou atividade de endo e exoquitinase, sendo mais eficaz na degradação da quitina. Além disso, esta enzima foi validada experimentalmente, por imunolocalização, estando presente durante o processo de penetração,

evidenciando a importância das quitinases no processo de patogenicidade (SILVA et al., 2005).

As enzimas lipolíticas vêm sendo descritas como essenciais para a patogenicidade de *M. anisopliae* (SILVA et al., 2009; BEYS DA SILVA et al., 2010-a; BEYS DA SILVA et al., 2010-b; SANTI et al., 2010-a; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). A diversidade de enzimas lipolíticas detectadas neste secretoma ratifica os trabalhos anteriores, onde foram detectadas lipases, cutinase e ceramidase somente quando o fungo foi desafiado com cutícula de carrapato. Anteriormente, a atividade de lipase mostrou-se fundamental para a infecção de carrapato bovino sendo detectada durante a infecção deste modelo, desde os estágios iniciais e progressivamente aumentado durante os 5 dias analisados (BEYS DA SILVA et al., 2010-a). Da mesma maneira, foi comprovado que o fungo modula a secreção de enzimas lipolíticas especificamente na presença de componentes da cutícula de artrópodes (BEYS DA SILVA et al., 2010-a). Isto reforça a ideia de que o fungo reconhece estes componentes e também ativa o sistema infectivo para o carrapato bovino. Além disso, estas enzimas são específicas, consistente com a alta complexidade dos lipídeos do hospedeiro (BEYS-DA-SILVA et al., 2014), sendo que fosfolipase C, uma enzima considerada um fator de virulência clássico de microrganismos, e cuja atividade já foi detectada no esporo do fungo anteriormente (SANTI et al., 2010-a), foi identificada regulada positivamente.

4.2 Defesa, resistência e adesão

Muitos autores sugerem que proteínas de tolerância/resistência ao stress e proteção tenham um papel na virulência fúngica (XIE et al., 2012; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Tirosinase, uma proteína associada com resistência à radiação UV em conídios foi regulada positivamente durante a infecção. Em outro fungo entomopatogênico, *B. bassiana*, esta proteína atua possivelmente durante a fase avançada da patogênese (SHANG et al., 2012). Este efeito se deveria ao fato que estas proteínas poderiam manipular o sistema redox do hospedeiro, alterando os mecanismos de sinalização e de resposta ao patógeno (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Tirosina fosfatase, juntamente com fosfatases (reguladas positivamente e

exclusivamente no secretoma) têm papel crítico na sinalização e resposta ao stress (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Estas enzimas foram descritas como fatores de virulência, alterando também o sistema imune hospedeiro: a primeira já foi descrita interferindo na imunidade dos insetos em resposta à infecções microbianas (LI et al., 2008). Além disso, as fosfatases atuam como mediadoras no processo de adesão na superfície do hospedeiro tendo, possivelmente, múltiplos papéis durante todo o processo infeccioso (COSENTINO-GOMES et al., 2013; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

Proteínas que interagem com a hidrofobicidade do conídio podem auxiliar o fungo na adesão à cutícula dos hospedeiros. Cell wall protein é uma proteína presente nos conídios, que potencialmente é responsável por aumentar a hidrofobicidade e a adesão de diferentes espécies fúngicas. Esta proteína atua também na morfogênese, patogenicidade, antigenicidade e defesa contra a resposta imunológica do hospedeiro (LI et al., 2010). Outras proteínas responsáveis pela adesão dos esporos são as adesinas. Recentemente, foi demonstrada a participação de uma adesina (MAD1) de *M. anisopliae* na adesão de esporos em larvas de *Manduca sexta*, sendo diminuída a germinação e a virulência em mutantes nulos para o gene que codifica esta proteína (WANG & ST LEGER, 2007).

Outras proteínas identificadas no secretoma de *M. anisopliae* podem atuar como efetoras, ainda sem função aparente na patogênese (putative effector 14, chitoooligosaccharide oxidase e putative galactose oxidase). Os efetores extracelulares são definidos como pequenas moléculas e também proteínas secretadas pelo patógeno, com função de alterar a estrutura e a função da célula hospedeira. Estes efetores fúngicos de sinalização ou proteínas interferentes, podem atuar sobre o sistema imunológico ou metabolismo do hospedeiro, modificando a resposta em benefício do agente patogênico (BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

4.3 Análise comparativa de secretomas

Recentemente, Beys-da-Silva et al. (2014) publicaram um artigo avaliando o secretoma total, utilizando *shotgun proteomics* pela primeira vez em *M. anisopliae*,

em condição artificial de infecção do inseto manchador do algodão *D. peruvianus*. Além disso, dados de dois outros trabalhos de imunoproteômica foram também utilizados para a comparação a seguir, uma vez que utilizaram os mesmos organismos-modelo (SANTI et al., 2009; 2010-b). Comparando-se o secretoma do fungo nestes dois diferentes hospedeiros, foi observado doze proteínas em comum (Tabela 3).

Tabela 3: Proteínas presentes nos secretomas de *M. anisopliae* em meio contendo carapaça de *R. microplus* ou *D. peruvianus*, em 48h.

Proteína	<i>R. microplus</i>		<i>D. peruvianus</i>		Referência
	up/down	Exclusiva	up/down	exclusiva	
1,2-a-D-mannosidase	X (+)		X (+)		Beys-da-Silva et al., 2014
5'-nucleotidase precursor	X (+)		X (-)		Beys-da-Silva et al., 2014
chitooligosaccharide oxidase		X		X	Beys-da-Silva et al., 2014
DNase 1 protein		X			Santi et al., 2010-b
glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	X (+)		X (+)		Beys-da-Silva et al., 2014
neutral ceramidase precursor		X		X	Beys-da-Silva et al., 2014
protein tyrosine phosphatase	X (+)		X (+)		Beys-da-Silva et al., 2014
proteinase inhibitor I4		X		X	Beys-da-Silva et al., 2014
regulatory P domain-containing protein		X		X	Beys-da-Silva et al., 2014
subtilisin-like serine protease PR1A	X (+)		X (+)		Beys-da-Silva et al., 2014; Santi et al., 2009; 2010-b
subtilisin-like serine protease PR1C		X	X (+)		Beys-da-Silva et al., 2014
Putative leucine aminopeptidase	X (+)		X (+)		Beys-da-Silva et al., 2014
Putative serine peptidase		X	X (-)		Beys-da-Silva et al., 2014

Das 189 proteínas identificadas, sendo 56 diferencialmente reguladas e 133 exclusivas da condição de infecção, somente 13 foram comuns aos trabalhos anteriores de secretomas de *M. anisopliae* cultivado em carapaça de *D. peruvianus* e *R. microplus*. Estas proteínas comuns a ambos poderiam ser consideradas como gerais para o processo de patogênese, enquanto as outras devem ser analisadas de maneira mais aprofundada futuramente, pois podem ser específicas para o hospedeiro carrapato.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado o secretoma de *M. anisopliae* cultivado em condição de infecção pelo carrapato bovino, *R. microplus*. Mais de 400 proteínas foram identificadas, sendo algumas relacionadas com a degradação da cutícula, fase de penetração, e comuns a outros hospedeiros-modelo. O fungo secreta diferentes proteínas que podem atuar diretamente sobre a cutícula, degradando-a, como também alterar a resposta do hospedeiro, melhorando as condições para a colonização, crescimento fúngico e sucesso da infecção. O processo patogênico é complexo e as proteínas identificadas aqui, especialmente as que não foram identificadas em outros secretomas, merecem uma investigação mais detalhada a fim de se avaliar seu real papel na infecção e potencial especificidade pelo hospedeiro. Esta avaliação poderá contribuir na melhoria das formulações contendo *M. anisopliae* ou na seleção de isolados mais eficientes, otimizando seu uso como agente biocontrolador de pragas da agricultura e pecuária.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, S.B. **Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos.** Editora Manole Ltda, Fealq, Piracicaba-SP, p.1163, 1998.

ARRUDA, W., LUBECK, I., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* structures during the penetration events leading to the infection of the cattle tick *Boophilus microplus*.** Experimental and Applied Acarology, v. 37, p. 231-244, 2005.

BAGGA, S., HU, G., SCREEN, S.E., ST LEGER, R.J. **Reconstructing the diversification of subtilisins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Gene, v. 324, p. 159-169, 2004.

BARKER, S.C., MURRELL, A. **Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names.** Parasitology, v. 129, p. 15-36, 2004.

BEYS DA SILVA, W.O., SANTI, L., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. ***Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection.** Fungal Biology, v. 114(1), p. 10–15, 2010 (a).

BEYS DA SILVA, W.O., SANTI, L., CORRÊA, A.P., SILVA, L.A., BRESCIANI, F.R., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle.** Fungal Biol, v. 114 (11–12), p. 911–916, 2010 (b).

BEYS-DA-SILVA, W.O., SANTI, L., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. **Biocontrol of the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the Acaricidal Fungus *Metarhizium anisopliae*.** In Ticks: Disease, Management and Control; Woldemeskel, M., Ed. Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, p. 217–246, 2012.

BEYS-DA-SILVA, W.O., SANTI, L., BERGER, M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Susceptibility of *Loxosceles* sp. to the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: potential biocontrol of the brown spider.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene, v. 107(1), p.59–61, 2013.

BEYS-DA-SILVA, W.O., SANTI, L., BERGER, M., CALZOLARI, D., PASSOS, D.O., GUIMARÃES, J.A., MORESCO, J.J., YATES, J.R. **Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection.** Journal of Proteome Research, v. 13, p. 2282-2296, 2014.

BIDOCHKA, M.J., ST. LEGER, R.J., ROBERTS, D.W. **Induction of novel proteins in *Manduca sexta* and *Blaberus giganteus* as a response of fungal challenge.** Journal of Invertebrate Pathology, v.70, p.184-189, 1997.

CARSOLIO, C., BENHAMOU, N., HARAN, S., CORTES, C., GUTIERREZ, A., CHET, I., HERRERA-ESTRELLA, A. **Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism.** Applied and Environmental Microbiology, v. 65, p. 929-935, 1999.

CLARKSON, J.M., CHARNLEY, A.K. **New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects.** Trends in Microbiology, v. 4, p. 197-204, 1996.

COLE, S.C.J., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M. **Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine proteinase from *Metarhizium anisopliae*.** FEMS Microbiology Letters, v. 113, p. 189-196, 1993.

COSENTINO-GOMES, D., ROCCO-MACHADO, N., SANTI, L., BROETTO, L., VAINSTEIN, M.H., MEYER-FERNANDES, J.R., SCHRANK, A., BEYS-DA-SILVA, W. O. **Inhibition of ecto-phosphatase activity in conidia reduces adhesion and virulence of *Metarhizium anisopliae* on the host insect *Dysdercus peruvianus*.** Current Microbiology, v. 66, p. 467-474, 2013.

DOMÍNGUEZ-GARCÍA, D.I., ROSARIO-CRUZ, R., ALMAZÁN-GARCÍA, C., OAXACA, J.A.S., DE LA FUENTE, J. ***Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal.** Tropical and Subtropical Agroecosystems, v. 12, p. 181-192, 2010.

DONG, L.Q., ZHANG, K.Q. **Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction.** Plant and Soil, v. 288, p. 31-45, 2006.

DUTRA, V., NAKAZATO, L., BROETTO, L., SCHRANK, I.S., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. **Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle.** Research in Microbiology, v. 155, p. 245-251, 2004.

ESTRADA-PEÑA, A., GARCÍA, Z., SÁNCHEZ, H.F. **The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico.** Experimental and Applied Acarology, v. 38, p. 307-316, 2006.

FANG, W., LENG, B., XIAO, Y., JIN, K., MA, J., FAN, Y., FENG, J., YANG, X., ZHANG, Y., PEI, P. **Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bchit1 and its application to improve fungal strain virulence.** Applied and Environmental Microbiology, v. 71, p. 363-370, 2005.

- FANG, W., PEI, Y., BIDOCHKA, M.J. **A regulator of a G protein signaling (RGS) gene, *cag 8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis.** *Microbiology*, v. 153, p. 1017-1025, 2007.
- FREIMOSER, F.M., SCREEN, S., BAGGA, S., HU, G., ST LEGER, R.J. **Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts.** *Microbiology*, v. 149, p. 239-247, 2003.
- FREIMOSER, F.M., HU, G., ST LEGER, R.J. **Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro.** *Microbiology*, v. 151, p. 361–371, 2005.
- GILLESPIE, J.P., BATEMAN, R., CHARNLEY, A.K. **Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 71, p. 128-137, 1998.
- GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R.S., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H.D., LEÓN, A.A.P., PEREIRA, J.B., VILLELA, H.S. **Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil.** *Veterinary Parasitology*, v. 23, p. 150–156, 2014.
- HECKEL, D.G. **Insecticide resistance after *Silent spring*.** *Science*, v. 337, p. 1612–1614, 2012.
- JONSSON, N.N., DAVIS, R., WITT, M. **An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms.** *Australian Veterinary Journal*, v. 79, n. 12, p. 826-831, 2001.
- JONSSON, N.N. **The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses.** *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 1-10, 2006.
- JOSHI, L., ST LEGER, R.J. **Cloning, expression, and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 9803-9811, 1999.
- KRIEGER DE MORAES, C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*.** *Current Microbiology*, v. 46, p. 205-210, 2003.
- LEAL, A.T., FREITAS, D.R.J., VAZ Jr., I.S. **Perspectivas para o controle do carrapato bovino.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p. 1-11, 2003.
- LEITE, L.G., BATISTA FILHO, A., ALMEIDA, J.E.M., ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos.** A.S. Pinto, Ribeirão Preto, p. 92, 2003.

LI, Z., WANG, C., XIA, Y. **Isolation of two Locust protein targets of a protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 99 (2), p. 151–155, 2008.

LI, Z., ALVES, S.B., ROBERTS, D.W., FAN, M., DELALIBERA, I.JR., TANG, J., LOPES, R.B., FARIA, M., RANGEL, D.E.N. **Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi.** Biocontrol Science Technology, v. 20, p. 117-136, 2010.

MANALIL, N.S., JUNIOR TÉO, V.S., BRAITHWAITE, K., BRUMBLEY, S., SAMSON, P., HELENA NEVALAINEN, K.M.H. **Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles.** Fungal Biology, v. 114, p. 637-645, 2010.

MANS, B.J., NEITZ, A.W. **Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 34, p. 1-17, 2004.

MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico.** Editora EMBRAPA, v. 1, p. 262, 1998.

MENDES, M.C., LIMA, C.K.P., NOGUEIRA, A.H.C., YOSHIHARA, E., CHIEBAO, D.P., GABRIEL, F.H.L., UENO, T.E.H., NAMINDOME, A., KLAFKE, G.M. **Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the state of São Paulo, Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 178, p. 383-388, 2011.

MESSIAS, C.L. **Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, p. 57-59, 1989.

MURAD, A.M., NORONHA, E.F., MILLER, R.N.G., COSTA, F.T., PEREIRA, C.D., MEHTA, A., CALDAS, R.A., FRANCO, O.L. **Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*.** Microbiology, v. 154, p. 3766-3774, 2008.

PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORREA-FERREIRA, B., BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores.** São Paulo: Editora Manole, p. 626, 2002.

PEDRINI, N., CRESPO, R., JUAREZ, M.P. **Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi.** Comparative Biochemistry and Physiology-part C, v. 146, p. 124-137, 2007.

QUIRINO, B.F., CANDIDO, E.S., CAMPOS, P.F., FRANCO, O.L., KRÜGER, R.H. **Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions.** Phytochemistry, v.71, p. 351-362, 2010.

RECK JR, J., BERGER, M., TERRA, R.M.S., MARKS, F.S., DA SILVA VAZ JR, I., GUIMARÃES, J.A., TERMIGNONI, C. **Systemic alterations of bovine hemostasis**

due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. Research in Veterinary Science, v. 86, p. 56-62, 2009.

SANTI, L. **Relação patógeno-hospedeiro: análise bioquímica e proteômica da interação do fungo *Metarhizium anisopliae* e seus hospedeiros artrópodes.** Tese de Doutorado. UFRGS, p.171, 2009.

SANTI, L., SILVA, W.O.B., PINTO, A.F.M., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection.** Research in Microbiology (Paris), v. 160, p. 824-828, 2009.

SANTI, L., BEYS DA SILVA, W.O., BERGER, M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis.** Toxicon v. 55, p. 874-880, 2010 (a).

SANTI, L., SILVA, W.O.B., PINTO, A.F., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. ***Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the interaction process of arthropods.** Fungal Biology, v. 114, p. 312-319, 2010 (b).

SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. ***Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins.** Toxicon, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SCREEN, S.E., ST LEGER, R.J. **Cloning, expression, and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium.** The Journal of Biological Chemistry, v. 275, p. 6689-6694, 2000.

SHAH, P.A., PELL, J.K. **Entomopathogenic fungi as biological control agents.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 61, p. 413-423, 2003.

SHANG, Y., DUAN, Z., HUANG, W., GAO, Q., WANG, C. **Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 109(1), p. 105-109, 2012.

SILVA, M.V., SANTI, L., STAATS, C.C., COSTA, A.M., COLODEL, E.M., DRIEMEIER, D., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. **Cuticle induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene.** Research in Microbiology, v. 156, p. 382-392, 2005.

SILVA, W.O.B. **Lipases de *Metarhizium anisopliae*: purificação parcial, regulação e secreção durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*.** Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, p.96, 2005.

SILVA, W.O.B., MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Process Biochemistry, v. 40, p. 321-326, 2005.

SILVA, W.O.B., SANTI, L., BERGER, M., PINTO, A.F.M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Characterization of a spore surface lipase from**

the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. Process Biochemistry, v. 44. p. 829-834, 2009.

STAATS, C.C., JUNGES, A., GUEDES, R.L.M., THOMPSON, C.E., MORAIS, G.L., BOLDO, J.T., ALMEIDA, L.G.P., ANDREIS, F.C., GERBER, A.L., SBARAINI, N., PAIXÃO, R.L.A., BROETTO, L., LANDELL, M., SANTI, L., BEYS-DA-SILVA, W.O., SILVEIRA, C.P., SERRANO, T.R., OLIVEIRA, E.S., KMETZSCH, L., VAINSTEIN, M.H., VASCONCELOS, A.T.R., SCHRANK, A. **Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins.** BMC Genomics, v. 15:822, p. 1-18, 2014.

ST LEGER, R.J., JOSHI, L., ROBERTS, D.W. **Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 64, p. 709-713, 1998.

ST LEGER, R.J., JOSHI, L., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. **Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 93, p. 6349-6354, 1996.

ST LEGER, R.J., BIDOCHKA, M.J., ROBERTS, D.W. **Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 313, p. 1-7, 1994.

ST. LEGER, R.J., STAPLES, R.C., ROBERTS, D.W. **Cloning and regulatory analyses of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydropholin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*.** Gene, v. 120, p. 119-124, 1992.

ST LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K. **Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 58, p. 415-426, 1991 (a).

ST LEGER, R.J., ROBERTS, D.W., STAPLES, R.C. **A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 57, p. 299-310, 1991.

ST LEGER, R.J., BUTT, T.M., STAPLES, R.S., ROBERTS, D.W. **Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Experimental Mycology, v. 13, p. 253-262, 1989.

VERÍSSIMO, C.J. **Fatores que afetam a fase de vida livre de carrapatos.** In.: Controle de carrapatos nas pastagens, Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 99, 2013.

VINCENT, J.F.V., WEGST, U.G.K. **Design and mechanical properties of insect cuticle.** Arthropod Structure and Development, v. 33, p. 187-199, 2004.

VEY, A., MATHA, V., DUMAS, C. **Effects of the mycotoxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 80, p. 177-187, 2002.

WANG, C., ST LEGER, R.J. **The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants.** Eukaryotic Cell, v. 6, p. 808-816, 2007.

WANG, C., ST. LEGER, R.J. **Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticle by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.** Eukaryotic Cell, v. 4, p. 937-947, 2005.

WASHBURN, M.P., WOLTERS, D., YATES, J.R. **Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.** Nature Biotechnology, v.19, p. 242-247, 2001.

WEBSTER, A., RECK, J., SANTI, L., SOUZA, U.A., DALL'AGNOL, B. KLAFKE, G.M., BEYS-DA-SILVA, W.O., MARTINS, J.R., SCHRANK, A. **Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions.** Veterinary Parasitology, v. 207, p. 302-308, 2015.

XIE, X.Q., LI, F., YING, S.H., FENG, M.G. **Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*.** PLoS One v. 7(1), 2012.